

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

ORESTE, Pasqua, et. al.

Examiner: KRISHNAN, Ganapathy

Serial No.: 09/950,003

Group Art Unit: 1623

Filed: September 12, 2001

Title: **GLYCOSAMINOGLYCANS DERIVED FROM K5 POLYSACCHARIDE
HAVING HIGH ANTICOAGULANT IN AND ANTITHROMBOTIC
ACTIVITIES AND PROCESS FOR THEIR PREPARATION**

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUPPLEMENTAL SUBMISSION

Sir:

Enclosed is a certified copy of the priority document for the above-identified application, which is Italian Patent Application No. MI2000A000665.

The Commissioner is hereby authorized to charge any fees associated with this response or credit any overpayment to Deposit Account No. 13-3402.

Respectfully submitted,

Richard J. Traverso, Reg. No. 30,595
Attorney for Applicant(s)

MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza I
2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400
Arlington, Virginia 22201
(703) 812-5310 [direct dial]
Internet Address: traverso@mwzb.com
Filed: December 24, 2003

RJT/jqs



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi al brevetto per:

Invenzione Industriale

N.

rilasciato il

1318432

25.08.2003

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito e per la quale è stato rilasciato il brevetto sopraspecificato.

Roma, li

2 DIC. 2003

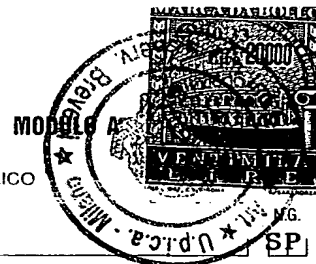
IL DIRIGENTE

Paola Giuliano
Dr.ssa Paola Giuliano

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione INALCO S.p.A.
 Residenza Milano codice 00861350155
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Diego Pallini ed altri cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza Notarbartolo & Gervasi S.p.A.
 via C.so di Porta Vittoria n. 9 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) A61K gruppo/sottogruppo 31/725

Glicosaminoglicani derivati dal polisaccaride K5 aventi elevata attività anticoa-
gulante ed antitrombotica e processo per la loro preparazione

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome
 1) ZOPPETTI Giorgio 3) CIPOLLETTI Giovanni
 2) ORESTE Pasqua 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) <u>nessuna</u>				
2) _____				

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc.	N. es.	PROV	n. pag.	n. tav.	DESCRIZIONE
Doc. 1)	<u>2</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>33</u>		riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2)	<u>2</u>	<input checked="" type="checkbox"/>		<u>12</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3)	<u>1</u>	<input checked="" type="checkbox"/>			lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4)	<u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>			designazione inventore
Doc. 5)	<u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>			documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	<u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>			autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	<u>0</u>				nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire CINQUECENTO SESSANTACINQUEMILA.= obbligatorio

COMPILATO IL 30/03/2000 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) Diego Pallini

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO codice 15

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI2000 A 000665

L'anno millenovecento DUEMILA il giorno TRENTA del mese di MARZO

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. _____ fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE _____

IL DEPOSITANTE

Notarbartolo & Gervasi

timbro
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

G. S. S. S.

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

Nu 2000 A 000665

REG. A

DATA DI DEPOSITO

30/03/2000

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

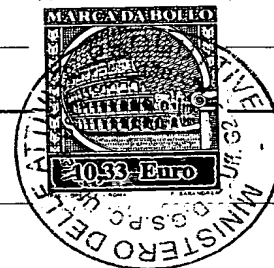
/ / /

D. TITOLO

Glicosaminoglicani derivati dal polisaccaride K5 aventi elevata attività anticoagulante ed antitrombotica e processo per la loro preparazione

L. RIASSUNTO

Glicosaminoglicani derivati dal polisaccaride K5 aventi elevata attività anticoagulante ed antitrombotica ottenuti mediante un processo comprendente la preparazione del polisaccaride K5 da Escherichia coli, N-deacetilazione/N-solfatazione, C-5 epimerizzazione, supersolfatazione, O-desolfatazione selettiva, 6-O solfatazione selettiva e N-solfatazione, in cui detta epimerizzazione é condotta mediante impiego dell'enzima glucuronosil C-5 epimerasi in soluzione o in forma immobilizzata in presenza di cationi bivalenti specifici.



M. DISEGNO

Descrizione della domanda di brevetto per invenzione industriale dal
titolo: Glicosaminoglicani derivati dal polisaccaride K5 aventi elevata
attività anticoagulante ed antitrombotica e processo per la loro
preparazione

a nome di: INALCO S.p.A.

con sede in: MILANO

inventori designati: ZOPPETTI Giorgio, ORESTE Pasqua, CIPOLLETTI
Giovanni

MI 2000A000665

30 MAR. 2000

* * * * *

Tecnica nota

I glicosaminoglicani sono biopolimeri estratti industrialmente da diversi
organi animali come la mucosa intestinale, polmone ecc.

In base alla loro struttura, i glicosaminoglicani sono divisi in eparina,
eparan solfato, dermatan solfato, condroitin solfato e acido ialuronico. In
particolare l'eparina e l'eparan solfato sono composti da unità
disaccaridiche ripetitive formate da un acido uronico (L-iduronico o D-
glucuronic) e da un aminozucchero (glucosammina).

L'acido uronico può essere solfatato in posizione 2 e la glucosammina
può essere per la maggior parte N-acetilata (eparan solfato) o N-
solfatata (eparina) e 6-O-solfatata. Inoltre la glucosammina può
contenere anche un gruppo solfato in posizione 3.

Eparina ed eparan solfato sono molecole polidisperse con un peso
molecolare che varia da 3.000 a 30.000 D.

Oltre alla nota attività anticoagulante e antitrombotica, all'eparina viene
riconosciuta anche un'attività antilipemica, antiproliferativa, antivirale,

antitumorale e antiangiogenetica. Per soddisfare la maggior richiesta di materia prima per queste nuove aree terapeutiche è necessaria una nuova via produttiva alternativa all'estrazione da tessuti animali. La biosintesi naturale dell'eparina nei mammiferi e le sue proprietà sono state descritte da Lindahl et al., 1986 in Lane D. and Lindahl U. (Eds.) "Heparin-Chemical and Biological Properties; Clinical Applications", Edward Arnold, London, pp. 159-190 and Lindahl U. Feingold D.S. and Rodén L., (1986) TIBS, 11,221-225.

Fondamentale per l'attività dell'eparina è la sequenza costituita dalla regione pentasaccaridica di legame per l'antitrombina III (ATIII), chiamata pentasaccaride attivo, che è la struttura necessaria per il legame ad alta affinità dell'eparina per l'ATIII. Questa sequenza contiene un'unica unità di glucosammina solfatata in posizione 3, che non è presente nelle altre parti della catena eparinica. Oltre all'attività attraverso l'ATIII, l'eparina esercita l'attività anticoagulante e antitrombotica attivando il cofattore eparinico II (HCII) con una conseguente inibizione selettiva della trombina. E' noto che la sequenza saccaridica minima richiesta per attivare l'HCII è una catena contenente almeno 24 monosaccaridi (Tollefsen D.M. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 16,66-70 (1990)).

Da lavori precedenti è noto che il polisaccaride capsulare K5 isolato dal ceppo di Escherichia Coli descritto da Vann W.F., Schmidt M.A., Jann B., Jann K. (1981) in Eur. J. Biochem 116, 359-364 mostra la stessa sequenza del precursore dell'eparina e dell'eparan solfato (N-acetil eparosano). Questo composto è stato chimicamente modificato come

descritto da Lormeau et al. nel brevetto US n. 5,550,116 e da Casu et al (Carb. Res 263-1994-271-284) o chimicamente e enzimaticamente come descritto da Jann et al. (WO 92/17509) e da Casu et al. Carb. Letters 1, 107-114 (1994). Queste modificazioni portano a prodotti con attività biologiche nei test in vitro sulla coagulazione che non sono però al livello dell'eparina da estrazione da organi animali.

Sommario

Noi abbiamo trovato nuovi glicosaminoglicani derivati dal polisaccaride K5 da Escherichia coli, aventi peso molecolare da 2.000 a 30.000, contenenti da 25 a 50% in peso delle catene ad alta affinità per l'ATIII ed aventi un'elevata attività anticoagulante ed antitrombotica che espressa come rapporto tra le attività HCII/antiXa, è compresa fra 1,5 e 4, con una prevalenza delle attività che implicano l'inibizione della trombina.

Detti glicosaminoglicani sono preparati mediante un processo comprendente vari stadi di trattamento chimico ed enzimatico ed è caratterizzato da uno stadio di epimerizzazione dell'acido D-glucuronico ad acido L-iduronico mediante impiego dell'enzima glucuronosil C-5 epimerasi in soluzione o in forma immobilizzata in presenza di cationi bivalenti specifici, detto enzima essendo scelto dal gruppo comprendente glucuronosil C-5 epimerasi ricombinante, glucuronosil C-5 epimerasi da mastocitoma murino e glucuronosil C-5 epimerasi da estrazione da fegato bovino e detti cationi bivalenti essendo scelti dal gruppo comprendente Ba, Ca, Mg e Mn.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce a glicosaminoglicani derivati dal polisaccaride K5 da *Escherichia coli* (in seguito denominato anche semplicemente K5), ottenuti mediante un processo che comprende i seguenti stadi:



- a) Preparazione del polisaccaride K5 da *Escherichia coli*
- b) N-deacetilazione/N-solfatazione
- c) C-5 epimerizzazione
- d) Supersolfatazione
- e) O-desolfatazione selettiva
- f) 6-O-solfatazione selettiva (opzionale)
- g) N-solfatazione

I vari stadi del processo vengono descritti in dettaglio come segue.

a) Preparazione del polisaccaride K5 da *Escherichia coli*

Viene dapprima eseguita una fermentazione in beuta secondo il brevetto

MI99A001465 e utilizzando il seguente medium:

Farina di soia degrassata	2 gr/l
K ₂ HPO ₄	9,7 gr/l
KH ₂ PO ₄	2 gr/l
MgCl ₂	0,11 gr/l
Sodio citrato	0,5 gr/l
Ammonio solfato	1 gr/l
Glucosio	2 gr/l
Acqua di fonte	1000 ml
pH = 7,3	

Il medium viene sterilizzato a 120°C per 20 minuti.

Il glucosio viene preparato separatamente in forma di soluzione che viene sterilizzata a 120°C per 30 minuti e addizionata sterilmente al medium.

La beuta viene inoculata con una sospensione di cellule di E. coli Bi 8337/41 (O10:K5:H4) proveniente da uno slant tenuto in Tryptic soy agar, e incubata a 37°C per 24 ore sotto agitazione controllata (160 rpm, 6 cm di corsa). La crescita batterica si misura contando le cellule con il microscopio.

In un'operazione successiva, un fermentatore Chemap-Braun da 14 l contenente lo stesso medium di cui sopra, viene inoculato allo 0,1% con la coltura della beuta di cui sopra e si effettua la fermentazione mediante aerazione di 1 vvm, (vvm = volume di aria per volume di liquido per minuto) agitazione 400 rpm e temperatura di 37°C per 18 ore. Durante la fermentazione vengono misurati il pH, l'ossigeno, il glucosio residuo, il polisaccaride K5 prodotto e la crescita batterica.

Alla fine della fermentazione la temperatura viene portata a 80°C per 10 minuti. Le cellule vengono separate dal medium tramite centrifugazione a 10.000 rpm e il surnatante viene ultrafiltrato usando un modulo SS 316 (MST) equipaggiato con membrane PES con cut-off nominale di 800 e 10.000 D per ridurre il volume a 1/5. Il polisaccaride K5 viene quindi precipitato mediante addizione di 4 volumi di acetone a 4°C e lasciato a sedimentare per una notte a 4°C, e infine viene recuperato mediante centrifugazione a 10.000 rpm per 20 minuti o filtrazione.

Si esegue poi la deproteinizzazione del solido ottenuto utilizzando una proteasi tipo II da *Aspergillus Orizae* in tampone di NaCl 0,1 M e EDTA

0,15 M a pH 8 contenente SDS allo 0,5% (10 mg/l di filtrato) a 37°C per 90 minuti.

La soluzione ottenuta viene ultrafiltrata su modulo SS 316 con membrane a cut-off nominale di 10.000 D con 2 estrazioni con NaCl 1M e lavata con acqua fino a scomparsa dell'assorbanza nell'ultrafiltrato. Il polisaccaride K5 viene quindi precipitato con acetone e si ottiene una resa di 850 mg per litro di fermentatore. La purezza del polisaccaride ottenuto viene misurata tramite la determinazione degli acidi uronici (metodo al carbazolo), NMR al protone e al carbonio 13, UV e contenuto di proteine. La purezza risulta maggiore dell' 80%.

Il polisaccaride ottenuto è composto da due frazioni a diverso peso molecolare medio, rispettivamente 30.000 e 5.000 D come risulta dalla determinazione mediante HPLC con due colonne in serie di Bio-sil SEC 250 (Bio Rad) e Na₂SO₄ come fase mobile a temperatura ambiente e flusso di 0,5 ml/minuti. La misura viene effettuata contro una curva standard ottenuta con frazioni di eparina a peso molecolare noto.

Ad una soluzione acquosa all'1% del polisaccaride K5 purificato viene aggiunto Triton X-100 fino ad ottenere una soluzione al 5%. Si lascia per 2 ore a 55°C sotto agitazione. Si aumenta la temperatura a 75°C e durante il raffreddamento successivo a temperatura ambiente si formano due fasi.

Sulla fase superiore (fase organica) viene ripetuto il trattamento termico con formazione delle due fasi, per altre due volte. La fase acquosa contenente il polisaccaride viene infine concentrata sotto pressione ridotta e precipitata con acetone o etanolo. La fase organica viene

scartata. La purezza del campione viene controllata tramite NMR al protone e risulta di 95%.

La resa di questo trattamento risulta del 90%.

b) N-deacetilazione/N-solfatazione

10 g. di polisaccaride K5 purificato vengono solubilizzati in 100-2000 ml di sodio idrossido 2N e lasciati reagire a 40-80°C per il tempo necessario per la completa deacetilazione, che non è mai superiore a 30 ore. La soluzione si porta a temperatura ambiente ed a pH neutro con acido cloridrico 6N.

La soluzione contenente il K5 deacetilato viene mantenuta a 20-65°C e addizionata con 10-40 g di sodio carbonato con singola aggiunta e con 10-40 g di un agente solfatante selezionato tra i reagenti disponibili come l'addotto piridina-solfotriossido, trimetilammina-solfotriossido ecc. . L'aggiunta dell'agente solfatante viene effettuata in tempo variabile fino a 12 ore. Alla fine della reazione, se necessario, la soluzione viene portata a temperatura ambiente, quindi a pH 7,5-8 con una soluzione al 5% di acido cloridrico.

Il prodotto viene purificato dai sali con tecniche note come ad esempio tramite diafiltrazione usando una membrana a spirale da 1.000 D (prepscale cartridge-Millipore). Il processo viene terminato quando la conducibilità del permeato è inferiore a 1000 μ S, preferibilmente inferiore a 100 μ S. Il prodotto trattenuto viene ridotto di volume fino ad ottenere una concentrazione del polisaccaride del 10% usando lo stesso sistema filtrante in concentrazione. La soluzione concentrata, se necessario, si essicca con metodologie comuni.

Il rapporto N-solfato/N-acetile risulta essere da 10/0 a 7/3 misurato tramite NMR al carbonio 13.

c) C-5 epimerizzazione:

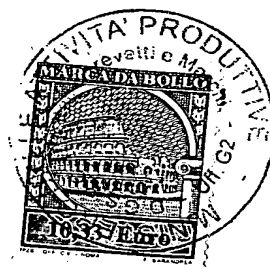
Lo stadio di C-5 epimerizzazione secondo la presente invenzione può essere condotto con enzima glucuronil C-5 epimerasi (denominato anche semplicemente C-5 epimerasi) in soluzione o in forma immobilizzata.

- C-5 epimerizzazione con enzima in soluzione.

Da $1,2 \times 10^7$ a $1,2 \times 10^{11}$ cpm (counts per minute) di enzima C-5 epimerasi naturale o ricombinante, calcolati seguendo il metodo descritto da Campbell P. et al Analytical Biochemistry 131, 146-152 (1983), vengono sciolti in 2-2000 ml di tampone Hepes 25 mM ad un pH da 5,5 a 7,4, contenente 0,001-10 g di K5 N-deacetilato N-solfato, ed uno o più degli ioni scelti tra bario, calcio, magnesio, manganese a concentrazione tra 10 e 60 mM. La reazione viene condotta ad una temperatura tra 30 e 40°C, preferibilmente 37°C, per 1-24 ore. Al termine della reazione l'enzima viene inattivato a 100°C per 10 minuti.

Il prodotto viene purificato mediante passaggio su resina DEAE o cartuccia DEAE Sartobind e staccato con NaCl 2M e infine desalato su resina Sephadex G-10 oppure viene purificato mediante precipitazione con 2 volumi di etanolo e passaggio su resina IR 120 H⁺ per ritrasformarlo in sale sodico.

Si ottiene un prodotto con rapporto acido iduronico/acido glucuronico compreso fra 40:60 e 60:40 calcolato con ¹H-NMR come già descritto nel brevetto WO96/14425.



- C-5 epimerizzazione con enzima immobilizzato

L'enzima C-5 epimerasi, naturale o ricombinante, può essere immobilizzato su vari supporti inerti che possono essere resine o membrane o palline di vetro derivatizzate con gruppi funzionali reattivi utilizzando le più comuni tecniche di legame per gli enzimi ad esempio con bromuro di cianogeno, con glutaraldeide, con carbodiimide oppure facendo reagire l'enzima con una resina a scambio ionico o facendolo adsorbire su una membrana. Secondo la presente invenzione, le reazioni di attacco dell'enzima al supporto inerte vengono effettuate in presenza del substrato K5 N-deacetilato N-solfato per evitare che il legame avvenga attraverso il sito attivo dell'enzima con conseguente perdita di attività.

La misurazione dell'attività dell'enzima immobilizzato, viene effettuata facendo ricircolare attraverso una colonna contenente l'enzima immobilizzato la quantità di K5 N-deacetilato N-solfato teoricamente convertibile dai cpm di enzima immobilizzato, disciolto in tampone Hepes 25 mM, KCl 0,1 M, Triton X100 0,01% ed EDTA 0,15 M a pH 7,4 a 37°C per una notte con flusso di 0,5 ml/minuto. Dopo la purificazione mediante sistema cromatografico DEAE e desalazione su Sephadex G-10 il prodotto viene liofilizzato e analizzato per il contenuto di acido iduronico tramite tecnica NMR al protone.

Il rapporto acido iduronico/acido glucuronico deve essere intorno a 30:70.

20-1000 ml di una soluzione di Hepes 25mM e pH tra 6 e 7,4 contenente uno o più ioni scelti fra bario, calcio, magnesio, manganese in

concentrazione compresa tra 10 e 60 mM e 0,001-10 g di K5 N-deacetilato N-solfato, termostata alla temperatura fra 30 e 40°C, vengono trattati a ricircolo ad un flusso di 30-160 ml/ora per un tempo compreso fra 1 e 24 ore in una colonna contenente da $1,2 \times 10^7$ a 3×10^{11} cpm equivalenti dell'enzima immobilizzato sul supporto inerte termostatato a temperatura compresa fra 30 e 40°C. Alla fine della reazione il campione viene purificato con le stesse procedure indicate nella epimerizzazione in soluzione.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto fra acido iduronico e acido glucuronico compreso tra 40:60 e 60:40.

d) Supersolfatazione

La soluzione contenente il prodotto epimerizzato dello stadio c) a concentrazione del 10% viene raffreddata a 10°C e quindi passata attraverso resina a scambio cationico IR-120 H⁺ o equivalente (35-100 ml). Sia la colonna che il contenitore dell'eluato sono mantenuti a 10°C. Dopo il passaggio della soluzione la resina viene lavata con acqua deionizzata fino a che il pH del permeato è maggiore di 6 (circa 3 volumi di acqua deionizzata). La soluzione acida viene portata a neutralità con una ammina terziaria o quaternaria come ad esempio il tetrabutylammonio idrossido (soluzione acquosa al 15%) ottenendo il relativo sale di ammonio. La soluzione viene concentrata a volume minimo e liofilizzata. Il prodotto ottenuto viene sospeso in 20-500 ml di DMF o DMSO e addizionato con 15-300 g di un agente solfatante come l'addotto piridina -SO₃ in forma solida oppure in soluzione di DMF o

DMSO. La soluzione viene mantenuta a 20-70°C, preferibilmente tra 40-60°C per 2-24 ore.

Alla fine della reazione la soluzione viene raffreddata a temperatura ambiente e addizionata con acetone saturato con sodio cloruro fino a completa precipitazione.

Il precipitato viene separato dal solvente tramite filtrazione, solubilizzato con la minima quantità di acqua deionizzata (ad esempio 100ml) e addizionato con sodio cloruro fino ad ottenere una soluzione 0,2 M. La soluzione viene portata a pH 7,5-8 con sodio idrossido 2 N e addizionata con acetone fino a completa precipitazione. Il precipitato viene separato dal solvente tramite filtrazione. Il solido ottenuto viene solubilizzato con 100 ml di acqua deionizzata e purificato dai sali residui tramite ultrafiltrazione come descritto nello stadio b).

Un'aliquota viene liofilizzata per l'analisi strutturale del prodotto supersolfatato tramite ^{13}C -NMR.

Il prodotto ottenuto risulta avere un contenuto di solfati per disaccaride di 2,0-3,5 calcolato secondo Casu et al. Carbohydr. Res. Vol. 39 pp 168-176 (1975). La posizione 6 dell'amminozucchero è solfatata all'80÷95% e la posizione 2 è completamente non solfatata. Gli altri gruppi solfato sono presenti nella posizione 3 dell'amminozucchero e 2 e 3 dell'acido uronico.

e) O-desolfatazione selettiva

La soluzione contenente il prodotto ottenuto dallo stadio d) viene passata attraverso resina a scambio cationico IR-120 H^+ o equivalente (35-100 ml). Dopo il passaggio della soluzione la resina viene lavata con



acqua deionizzata fino a che il pH del permeato è maggiore di 6 (circa 3 volumi di acqua deionizzata). La soluzione acida viene portata a neutralità mediante aggiunta di piridina. La soluzione viene concentrata a volume minimo e liofilizzata. Il prodotto ottenuto viene trattato con 20-2000 ml di una soluzione di DMSO/metanolo (9/1 V/V) e la soluzione ottenuta viene mantenuta a 45-90°C per 1-8 ore. Al termine la soluzione viene addizionata con 10-200 ml di acqua deionizzata e poi viene trattata con acetone saturo di sodio cloruro in quantità tale da completare la precipitazione.

Con la O-desolfatazione selettiva vengono eliminati dapprima i gruppi solfato dalla posizione 6 dell'amminozucchero, poi quelli delle posizioni 3 e 2 dell'acido uronico ed infine quello della posizione 3 dell'amminozucchero.

Il solido ottenuto viene purificato mediante diafiltrazione come descritto nello stadio b).

Un'aliquota viene liofilizzata per l'analisi strutturale tramite ^{13}C -NMR.

Qualora l'analisi NMR riveli un contenuto di solfati in posizione 6 dell'amminozucchero superiore al 60%, calcolato come descritto da Casu et al *Arzneimittel-forschung Drug research* 33-1, 135-142 (1983) si procede direttamente allo stadio g). Altrimenti si prosegue con lo stadio seguente.

f) 6-O-solfatazione selettiva (opzionale)

La soluzione contenente il prodotto dello stadio e) viene trattata come descritto nello stadio d) per l'ottenimento del sale di ammonio terziario o quaternario, operando però a 20-25°C.

Il sale di ammonio viene sospeso in 20-500 ml di DMF. La sospensione viene raffreddata a 0°C e trattata con una quantità di un agente solfatante come l'addotto piridina-SO₃ calcolata in funzione della percentuale di solfato in posizione 6 dell'amminozucchero da ripristinare considerando un minimo di 6-O-solfato del 60% calcolato come descritto sopra. Tale quantità di agente solfatante è compresa tra i due e i dieci equivalenti rispetto alle funzioni idrossile da solfatare. L'agente solfatante viene addizionato tramite singola aggiunta oppure con aggiunte successive in un tempo totale massimo di 20 minuti.

L'agente solfatante può essere in polvere ovvero disciolto in piccola quantità di DMF.

La soluzione si mantiene a 0-5°C per 0,5-3 ore. La soluzione viene quindi trattata con acetone saturo di sodio cloruro in quantità tali da completare la precipitazione.

Il solido ottenuto viene purificato tramite diafiltrazione come descritto nello stadio b).

Un'aliquota viene liofilizzata per l'analisi strutturale tramite ¹³C-NMR.

Qualora il contenuto di 6-O-solfato sia inferiore al 60% misurato con tecnica NMR, lo stadio f) viene ripetuto.

g) N-solfatazione

La soluzione proveniente dallo stadio f) o, eventualmente, dallo stadio e) viene trattata come descritto nello stadio b) per l'N-solfatazione.

I glicosaminoglicani ottenuti mediante il processo dell'invenzione vengono caratterizzati tramite NMR al protone e al carbonio 13 e

mediante test biologici come l'antiXa, l'APTT, l'HCII, Anti IIa e affinità per ATIII.

Il prodotto ottenuto può essere sottoposto a frazionamento tramite tecnica cromatografica su colonna oppure ultrafiltrazione ottenendo frazioni a basso peso molecolare da 2000 a 8000 D e ad alto peso molecolare da 25.000 a 30.000 D oppure il prodotto può essere sottoposto a depolimerizzazione controllata tramite tecniche note come ad esempio la deaminazione con acido nitroso come descritto in WO8203627.

Le caratteristiche tipiche riguardanti l'attività biologica di glicosaminoglicani ottenuti mediante il processo dell'invenzione (IN-2018 UF ed IN-2018 LMW) sono riportate nella tabella 1, in confronto con Eparina UF (4th int. Standard) ed Eparina LMW (1st int. Standard).

Tabella 1

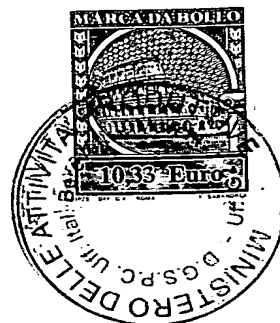
Attività biologica del prodotto ottenuto mediante il processo descritto:

	Campione	Eparina UF (4 th int. Standard)	Eparina LMW (1 st int. Standard)	IN-2018 UF	IN-2018 LMW
1	Anti Xa	100	84	70-250	40-100
2	APTT	100	30	40-90	25-80
3	HCII	100	n.d.	300-500	100-200
4	Anti IIa	100	33	100-600	20-210
5	Peso molecolare medio	13500	4500	18000-30000	4000-8000
6	Affinità ATIII	32%	n.d.	25-50	20-40

RIFERIMENTI

1. Thomas D.P. et al Thrombosis and Haemostasis 45, 214-(1981)
contro il IV standard internazionale di eparina
2. Andersson et al. Thrombosis Res. 9, 575 (1976) contro il IV standard
internazionale di eparina.
3. Il test viene eseguito miscelando 20 µl di una soluzione di HCII
(Stago) 0,05 PEU/ml sciolto in acqua con 80 µl di una soluzione del
campione in esame a diverse concentrazioni e 50 µl di trombina (0,18
U/ml- Boehringer) in tampone tris 0,02 M, pH 7,4, contenente NaCl
0,15 M e PEG-6000 0,1%. La soluzione viene incubata per 60 sec. a
37°C, quindi vengono aggiunti 50 µl di substrato cromogenico
Spectrozyme (American Diagnostic) 1 mM. La reazione viene
registrata in continuo per 180 sec. con letture ogni secondo a 405
nm utilizzando un coagulometro automatico ACL-7000 (IL).

134



4. Il test viene eseguito miscelando 30 μ l di una soluzione di ATIII (Chromogenix) 0,5 U/ml sciolta in tampone tris 0,1 M, pH 7,4, con 30 μ l di una soluzione del campione in esame a diverse concentrazioni e 60 μ l di trombina (5,3 nKat/ml- Chromogenix) in tampone tris 0,1 M pH 7,4. La soluzione viene incubata per 70 sec. a 37°C, quindi vengono aggiunti 60 μ l di substrato cromogenico S-2238 (Chromogenix) 0,5 mM in acqua. La reazione viene registrata in continuo per 90 sec. con letture ogni secondo a 405 nm utilizzando un coagulometro automatico ACL-7000 (IL).
5. Harenberg and De Vries J. Chromatography 261, 287-292 (1983)
6. Hook M. et al FEBS letters 66, 90-93 (1976).

Dalla tabella si evidenzia che il prodotto ottenuto con il presente processo mostra attività comparabile con l'eparina estrattiva nel test riferito al fattore Xa (1) e ridotta l'attività anticoagulante globale (2) mentre risultano marcatamente maggiori i valori dei test che si riferiscono all'inibizione della trombina (3,4). Queste caratteristiche configurano nel prodotto ottenuto maggiori proprietà antitrombotiche e minori effetti collaterali come l'effetto bleeding rispetto all'eparina estrattiva.

Grazie alle loro caratteristiche, i glicosaminoglicani secondo la presente invenzione possono essere impiegati, da soli o in forma di combinazioni con eccipienti o diluenti farmaceuticamente accettabili, per il trattamento anticoagulante ed antitrombotico.

13/2

Pertanto la presente invenzione comprende anche le composizioni contenenti una quantità efficace di detti glicosaminoglicani in combinazione con eccipienti o diluenti farmaceuticamente accettabili.

Infine la presente invenzione si riferisce anche ad un metodo terapeutico comprendente la somministrazione di una quantità efficace di detti glicosaminoglicani per il trattamento anticoagulante e antitrombotico.

A scopo illustrativo dell'invenzione vengono riportati i seguenti esempi.

ESEMPIO 1

L'esempio 1 viene condotto secondo i seguenti stadi:

- a) 10 g. di polisaccaride K5 ottenuto tramite fermentazione come descritto nel brevetto MI99A001465 avente purezza dell' 80% (Fig. 2) vengono disciolti in acqua deionizzata al fine di ottenere una soluzione all'1%. Si aggiunge Triton X-100 fino ad ottenere una soluzione al 5% e la soluzione è mantenuta per 2 ore a 55°C sotto agitazione.

La soluzione viene riscaldata a 75°C e mantenuta a questa temperatura fino a formazione di un sistema torbido omogeneo e poi la soluzione viene rapidamente raffreddata a temperatura ambiente.

Nel raffreddamento si formano due fasi.

Sulla fase superiore (fase organica) viene ripetuto detto trattamento termico per altre due volte. La fase acquosa contenente il polisaccaride K5 viene infine concentrata ad 1/10 del volume sotto pressione ridotta e precipitata con acetone o etanolo.

La fase organica viene scartata.

Il prodotto recuperato è costituito da polisaccaride K5 di purezza 90%, controllata tramite NMR al protone (Fig. 3) rispetto allo spettro dello standard interno (Fig. 1).

- b) Il prodotto ottenuto dallo stadio a) viene solubilizzato con 1000 ml di sodio idrossido 2N e lasciato a 60°C per 18 ore. La soluzione si porta a temperatura ambiente e poi a pH neutro con acido cloridrico 6N. Si ottiene così il polisaccaride K5 N-deacetilato.

La soluzione contenente il K5 N-deacetilato viene mantenuta a 40°C e addizionata con 10 g di sodio carbonato con singola aggiunta e 10 g. di addotto piridina-solfotriossido in 10 minuti. Alla fine della reazione, la soluzione viene portata a temperatura ambiente, quindi a pH 7,5-8 con una soluzione al 5% di acido cloridrico.

Il prodotto ottenuto, costituito dal polisaccaride K5 N-deacetilato N-solfato, viene purificato dai sali tramite diafiltrazione usando una membrana a spirale da 1.000 D (prepscale cartridge-Millipore). Il processo di purificazione viene terminato quando la conducibilità del permeato è inferiore a 100 μ S.

Il prodotto trattenuto dalla membrana viene portato a concentrazione del 10% del polisaccaride usando lo stesso sistema di diafiltrazione e quindi viene liofilizzato.

Il rapporto N-solfato/N-acetile nel prodotto ottenuto risulta essere di 9,5/0,5, misurato tramite NMR al carbonio 13 (Fig. 4).

- c) 1- Preparazione dell'enzima C-5 epimerasi immobilizzato

A 5 mg di C-5 epimerasi ricombinante ottenuta secondo il brevetto WO98/48006 corrispondente a $1,2 \times 10^{11}$ cpm (counts per minute)

18

disciolti in 200 ml di tampone Hepes 0,25 M, pH 7,4, contenente KCl 0,1 M, Triton X-100 0,1% e EDTA 15 mM, vengono addizionati 100 mg di K5 N-deacetilato N-solfato ottenuto come descritto nello stadio b). La soluzione viene diafiltrata in una membrana da 30.000 D a 4°C fino a scomparsa del K5 N-deacetilato N-solfato nel diafiltrato. Alla soluzione trattenuta dalla membrana viene quindi cambiato il tampone mediante diafiltrazione sostituendolo con NaHCO₃ 200 mM a pH 7 e, dopo concentrazione a 50 ml, si aggiungono 50 ml di resina attivata CNBr Sepharose 4b e si lascia reagire per una notte a 4°C.

Alla fine della reazione la quantità di enzima residuo nel surnatante viene misurata con il metodo Quantigold (Diversified Biotec) dopo centrifugazione. L'enzima nel surnatante risulta assente, dimostrando che con il metodo descritto l'enzima viene immobilizzato al 100%. Per occupare i siti della resina rimasti disponibili la resina viene lavata con tampone TRIS-HCl 100 mM a pH 8.

Per la misurazione dell'attività dell'enzima immobilizzato, una quantità di enzima immobilizzato teoricamente corrispondente a $1,2 \times 10^7$ cpm, viene caricato in una colonna. Nella colonna così preparata si tratta 1 mg di K5 N-deacetilato N-solfato ottenuto come descritto nello step b) disciolto in tampone Hepes 25 mM, KCl 0,1M, EDTA 0,015M, Triton X-100 0,01%, a pH 7,4, facendolo ricircolare attraverso detta colonna a 37°C per una notte con flusso di 0,5 ml/minuto.

Dopo la purificazione tramite sistema cromatografico DEAE e desalazione su Sephadex G10 il campione viene liofilizzato e



analizzato per il contenuto di acido iduronico tramite tecnica NMR al protone come già descritto nel brevetto WO96/14425.

Il rapporto acido iduronico/acido glucuronico è 30/70. (Fig. 5).

2-Epimerizzazione.

10 g del polisaccaride K5 N-deacetilato N-solfato vengono disciolti in 600 ml di tampone HEPES 25 mM, pH 6,5, contenente CaCl_2 50 mM. La soluzione ottenuta viene fatta ricircolare attraverso una colonna da 50 ml caricata con la resina contenente l'enzima immobilizzato.

Questa operazione è condotta a 37°C con un flusso di 200 ml/h per 24 ore.

Il prodotto ottenuto viene purificato tramite ultrafiltrazione e precipitazione con etanolo. Il precipitato viene risolubilizzato in acqua ad una concentrazione del 10%.

Si ottiene un prodotto epimerizzato con rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 48 / 52 contro un rapporto di 0 / 100 del prodotto di partenza.

La percentuale di epimerizzazione è stata calcolata con ^1H -NMR (fig. 6).

La resa, calcolata misurando il contenuto di acidi uronici contro standard col metodo al carbazolo (Bitter and Muir Anal. Biochem. 39, 88-92-1971) è pari al 90%.

- d) La soluzione contenente il prodotto epimerizzato con concentrazione 10% proveniente dallo stadio c) viene portata a 10°C con bagno raffreddato e poi viene passata su resina a scambio cationico IR-120

H⁺ (50 ml). Sia la colonna che il contenitore dell'eluato sono mantenuti a 10°C. Dopo il passaggio della soluzione la resina viene lavata con 3 volumi di acqua deionizzata. Il pH del permeato risulta maggiore di 6. La soluzione acida viene portata a neutralità con una soluzione acquosa al 15% di tetrabutylammonio idrossido. La soluzione risultante viene concentrata a 1/10 del volume in evaporatore rotante a 40°C sotto vuoto, e liofilizzata.

Il prodotto viene sospeso in 200 ml di DMF e addizionato con 150 g dell'addotto piridina-SO₃ disciolti in 200 ml di DMF. La soluzione viene mantenuta a 45°C per 18 ore.

Alla fine della reazione la soluzione viene raffreddata a temperatura ambiente e addizionata con 1200 ml di acetone saturato con sodio cloruro.

Il precipitato ottenuto viene separato dal solvente tramite filtrazione, solubilizzato con 100 ml di acqua deionizzata e addizionato con sodio cloruro fino ad ottenere una soluzione 0,2 M. La soluzione viene portata a pH 7,5-8 con sodio idrossido 2 N e addizionata con 300 ml di acetone. Il precipitato viene separato mediante filtrazione. Il solido ottenuto viene solubilizzato con 100 ml di acqua deionizzata e purificato dai sali residui tramite diafiltrazione come descritto nello stadio b).

L'analisi ¹³C-NMR su un'aliquota liofilizzata del prodotto supersolfatato è mostrata in fig. 7.

e) La soluzione contenente il prodotto dello stadio d) viene passata su resina a scambio cationico IR-120 H⁺ (50 ml). Dopo il passaggio della

soluzione la resina viene lavata con 3 volumi di acqua deionizzata. Il pH del permeato risulta maggiore di 6. La soluzione acida viene portata a neutralità con piridina. La soluzione risultante viene concentrata a 1/10 del volume in evaporatore rotante a 40°C sotto vuoto, e liofilizzata.

Il prodotto ottenuto, in forma di sale di piridina, viene addizionato con 500 ml di una soluzione di DMSO/metanolo (9/1 V/V). La soluzione viene mantenuta a 60°C per 3,5 ore e poi viene addizionata con 50 ml di acqua deionizzata ed infine viene trattata con 1650 ml di acetone saturo di sodio cloruro.

Il solido ottenuto viene purificato tramite diafiltrazione come descritto nello stadio b) ottenendo una soluzione con concentrazione 10%.

L'analisi ^{13}C -NMR su un'aliquota liofilizzata è riportato in fig. 8 e mostra un contenuto di solfati in posizione 6 dell'amminozucchero del 35%.

- f) La soluzione contenente il prodotto dello stadio e) viene passata su resina a scambio cationico IR-120 H^+ (50 ml). Dopo il passaggio della soluzione la resina viene lavata con 3 volumi di acqua deionizzata. Il pH del permeato risulta maggiore di 6. La soluzione acida viene portata a neutralità con una soluzione acquosa al 15% di tetrabutylammonio idrossido. La soluzione risultante viene concentrata a 1/10 del volume in evaporatore rotante a 40°C sotto vuoto, e liofilizzata.

Il prodotto, in forma di sale di tetrabutylammonio, viene sospeso in 200 ml di DMF. La sospensione viene raffreddata a 0°C e trattata

con 40 g dell'addotto piridina-SO₃ disciolto in 100 ml di DMF.

L'agente solfatante viene addizionato tramite singola aggiunta.

La soluzione si lascia a 0°C per 1,5 ore e poi viene trattata con 750 ml di acetone saturo di sodio cloruro.

Il solido ottenuto viene purificato tramite diafiltrazione come descritto nello stadio b).

- g) La soluzione proveniente dallo stadio f) viene trattata come descritto nello stadio b) per l'N-solfatazione.

L'analisi ¹³C-NMR su un'aliquota liofilizzata del prodotto ottenuto è mostrata in fig. 9.

Il prodotto ottenuto mostra le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche riportate in tabella 2 – riga 3 confrontate con il IV° standard internazionale di eparina e il I° standard internazionale di eparina a basso peso molecolare.

Esempio 2

E' stato ripetuto l'esempio 1 con la differenza che nello stadio c) è stato impiegato l'enzima immobilizzato C-5 epimerasi estratto da mastocitoma murino come descritto da Jacobsson et al J. Biol. Chem. 254, 2975-2982 (1979), con un tampone di reazione contenente CaCl₂ 40mM, pH 7,4.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 59,5 : 40,5 e le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 4.

Esempio 3

E' stato ripetuto l'esempio 1 con la differenza che nello stadio c) è stato impiegato l'enzima immobilizzato C-5 epimerasi estratto da fegato



bovino come descritto in WO96/14425, con un tampone di reazione a pH 7,4 e tempo di reazione di 32 ore. Inoltre nello stadio e) il tempo di reazione è stato di 4 ore.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 55,4 : 44,6 e le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 5.

Esempio 4

Viene ripetuto l'esempio 1 con la differenza che nello stadio c) viene impiegato l'enzima ricombinante C-5 epimerasi in soluzione, impiegando per l'epimerizzazione 10 g di K5 N-deacetilato N-solfato disciolti in 1000 ml di tampone HEPES 25 mM pH 6,5 contenente CaCl_2 50 mM. A questa soluzione vengono addizionati $1,5 \times 10^{11}$ cpm equivalenti di enzima ricombinante descritto nell'esempio 1. La soluzione viene mantenuta a 37°C per 24 ore. La soluzione viene poi trattata a 100°C per 10 minuti per denaturare l'enzima ed infine viene filtrata su filtro 0,45 μ per ottenere la soluzione limpida contenente il prodotto. Il prodotto ottenuto viene poi purificato tramite diafiltrazione e precipitazione con etanolo o acetone. Il precipitato viene risolubilizzato in acqua ad una concentrazione del 10% e trattato come nell'esempio 1 mantenendo però il tempo di reazione dello stadio e) per 2 ore.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 56 : 44 e le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 6.

Esempio 5

Viene ripetuto l'esempio 4 impiegando nello stadio c) l'enzima da mastocitoma murino già descritto nell'esempio 2, in soluzione, con

tampone di reazione a pH 7,4 contenente BaCl_2 40 mM e mantenendo la reazione per 18 ore. Inoltre nello stadio e) il tempo di reazione è di 3 ore. Il prodotto ottenuto presenta un rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 40,1 : 59,9 e le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 7.

Esempio 6

Viene ripetuto l'esempio 4 impiegando nello stadio c) l'enzima C-5 epimerasi da fegato bovino già descritto nell'esempio 3, in soluzione con tampone di reazione contenente MnCl_2 12,5 mM e mantenendo la reazione per 14 ore. Inoltre nello stadio e) il tempo di reazione è di 4 ore. Il prodotto ottenuto presenta un rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 44,3 : 55,7 e le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 8.

Esempio 7

Viene ripetuto l'esempio 4 impiegando nello stadio c) un tampone di reazione a pH 7,4 contenente MgCl_2 37,5 mM e mantenendo la reazione per 16 ore. Inoltre nello stadio e) il tempo di reazione è di 4 ore. Il prodotto ottenuto presenta un rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 47,5 : 52,5 e le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 9.

Esempio 8

Viene ripetuto l'esempio 3 impiegando nello stadio c) un tampone di reazione a pH 7,0 contenente MgCl_2 10 mM, CaCl_2 5 mM, MnCl_2 10 mM e mantenendo la reazione per 24 ore. Inoltre nello stadio e) il tempo di reazione è di 3 ore.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 44,8 : 55,2 e le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 10.

Esempio 9

Viene ripetuto l'esempio 6 impiegando nello stadio c) un tampone di reazione a pH 7,4 contenente $MgCl_2$ 10 mM, $CaCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM e mantenendo la reazione per 24 ore. Inoltre nello stadio e) il tempo di reazione è di 3 ore.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 52 : 48 e le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 11.

Esempio 10

Il campione ottenuto nell'esempio 3 avente una distribuzione dei pesi molecolari ottenuta secondo Harenberg and De Vries J. Chromatography 261, 287-292 (1983) (Fig. 10) viene sottoposto a separazione tramite tecnica di gel filtrazione. In particolare 1 grammo di prodotto viene disciolto in 20 ml di soluzione tampone NaCl 1 M e deposto su una colonna contenente 1000 ml di resina Sephacryl HR S-400 (Amersham-Pharmacia). La colonna viene quindi eluita con 2000 ml di soluzione tampone NaCl 1 M e raccolta in frazioni uguali da 50 ml tramite raccogliatore di frazioni (Gilson). Dopo la determinazione del contenuto di prodotto su ogni frazione tramite analisi al carbazolo (Bitter and Muir Anal. Biochem. 39, 88-92-1971) le frazioni risultanti contenenti il campione vengono raggruppate in frazione A e frazione B rispettivamente corrispondenti alla porzione ad alto peso molecolare e a basso peso molecolare. Queste frazioni dopo concentrazione al 10



per cento del volume tramite evaporatore sotto vuoto vengono desalate in colonna contenente 500 ml di resina Sephadex G-10 (Amersham-Pharmacia).

Le soluzioni contenenti i prodotti desalati vengono liofilizzate ottenendo la frazione A e la frazione B (fig. 11 A e fig. 11 B). I prodotti ottenuti presentano le caratteristiche descritte nella tabella 2 righe 12 e 13.

Esempio 11

Il campione ottenuto nell'esempio 4 viene sottoposto a degradazione controllata con acido nitroso come descritto nel brevetto WO 8203627. In particolare 5 g di campione vengono disciolti in 250 ml di acqua e portati a 4°C con bagno termostato. Il pH si porta a 2.0 con acido cloridrico 1 N raffreddato a 4°C e poi vengono addizionati velocemente 10 ml di una soluzione di sodio nitrito all'1%. Se necessario il pH viene riportato a 2 con acido cloridrico 1 N e si mantiene sotto agitazione lenta per 15 minuti. La soluzione viene neutralizzata con NaOH 1N raffreddata a 4°C. Si aggiungono quindi 250 mg di sodio boro idruro disciolti in 13 ml di acqua deionizzata e si lascia reagire per 4 ore. Si porta a pH 5,0 con acido cloridrico 1 N e si lascia per 10 minuti per distruggere l'eccesso di sodio boro idruro, e poi si neutralizza con NaOH 1N. Il prodotto viene recuperato tramite precipitazione con 3 volumi di etanolo e poi viene essiccato in stufa a vuoto. Il prodotto ottenuto presenta le caratteristiche descritte nella tabella 2 riga 14.



TABELLA 2 – Attività anticoagulante ed antitrombotica dei prodotti ottenuti dagli esempi descritti.

	1)Anti Xa (%)	2)APTT (%)	3)HCII (%)	4)Anti IIa (%)	5)MW	6)Affinità ATIII(%)
EparinaUF (4 th int. STD)	100	100	100	100	13500	32%
Eparina LMW (1 st Int. Std)	84	30		33	4500	n.d.
Esempio 1	76.6	43,4	256	118	15200	29
Esempio 2	94,3	57	294	208	13500	29,5
Esempio 3	112	88	346	223	14600	28
Esempio 4	157	71,5	362	600	22500	29
Esempio 5	150	70	352	213	24000	31
Esempio 6	150	79	335	333	23000	33
Esempio 7	120	92	346	247	13000	29
Esempio 8	153	75	332	240	22500	34
Esempio 9	157	71	346	233	23000	35
Esempio 10-A	250	70,8	480	435	30000	48
Esempio 10-B	43	77,7	145	27,3	7600	24
Esempio 11	97,5	55,5	230	210	5400	25

I riferimenti da 1) a 6) hanno il significato descritto per la tabella 1.

Dalla tabella si evidenzia che il prodotto ottenuto con il presente processo mostra attività comparabili con l'eparina estrattiva nei test riferiti al fattore Xa (1) mentre è ridotta l'attività anticoagulante globale (2)

e sono marcatamente maggiori quei test che si riferiscono all'inibizione della trombina (3,4). Queste caratteristiche configurano nel prodotto maggiori proprietà antitrombotiche e minori effetti collaterali come l'effetto bleeding rispetto all'eparina estrattiva.

RIVENDICAZIONI

1. Derivati del polisaccaride K5 N-deacetilati N-solfatati, epimerizzati almeno fino al 40% di acido L-iduronico rispetto al totale di acidi uronici, aventi peso molecolare da 2.000 a 30.000 D, contenenti da 25 a 50% in peso delle catene ad alta affinità per l'ATIII ed aventi un'attività anticoagulante ed antitrombotica espressa come rapporto HCII/antiXa compresa fra 1,5 e 4.
2. Derivati secondo la rivendicazione 1, caratterizzati dal fatto di avere peso molecolare compreso fra 4.000 e 8.000 D.
3. Derivati secondo la rivendicazione 1, caratterizzati dal fatto di avere peso molecolare compreso fra 18.000 e 30.000 D.
4. Processo per la preparazione di derivati del polisaccaride K5 come definiti nella rivendicazione 1, comprendente in sequenza la preparazione del polisaccaride K5 da Escherichia Coli, N-deacetilazione ed N-solfatazione, C-5 epimerizzazione dell'acido D-glucuronico ad acido L-iduronico, supersolfatazione, O-desolfatazione selettiva, 6-O-solfatazione selettiva ed N-solfatazione, caratterizzato dal fatto che detta C-5 epimerizzazione è condotta mediante impiego dell'enzima glucuronosil C-5 epimerasi in soluzione o in forma immobilizzata in presenza di cationi bivalenti specifici.
5. Processo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che detto enzima è scelto dal gruppo comprendente glucuronosil C-5 epimerasi ricombinante, glucuronosil C-5 epimerasi da mastocitoma murino e glucuronosil C-5 epimerasi da estrazione da fegato bovino.

6. Processo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che detti cationi bivalenti sono scelti dal gruppo comprendente Ba, Ca, Mg e Mn e vengono utilizzati singolarmente o in combinazione tra loro.
7. Processo secondo le rivendicazioni da 4 a 6, caratterizzato dal fatto che detta C-5 epimerizzazione con l'enzima in soluzione è condotta mediante dissoluzione di una quantità di enzima C-5 epimerasi compresa fra $1,2 \times 10^7$ e $1,2 \times 10^{11}$ cpm in 2-2000 ml di tampone Hepes 25 mM ad un pH da 5,5 a 7,4 contenente da 0,001 a 10 g di K5 N-deacetilato N-solfatato ed uno o una combinazione di detti cationi a concentrazione compresa fra 10 e 60 mM.
8. Processo secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detta C-5 epimerizzazione con l'enzima in soluzione è condotta a temperatura compresa fra 30 e 40°C per un tempo compreso fra 1 e 24 ore.
9. Processo secondo le rivendicazioni da 4 a 6, caratterizzato dal fatto che detta C-5 epimerizzazione con l'enzima in forma immobilizzata è condotta facendo ricircolare 20-1000 ml di una soluzione di Hepes 25 mM ad un pH da 6 a 7,4, contenente 0,001-10 g di K5 N-deacetilato N-solfatato ed uno di detti cationi a concentrazione compresa fra 10 e 60 mM, attraverso una colonna contenente da $1,2 \times 10^7$ a 3×10^{11} cpm dell'enzima immobilizzato su un supporto inerte.
10. Processo secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detta C-5 epimerizzazione è condotta a temperatura fra 30 e 40°C

2288PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

facendo ricircolare detta soluzione con un flusso di 30-160 ml/ora per
un tempo compreso fra 1 e 24 ore.

(PIC/Im)

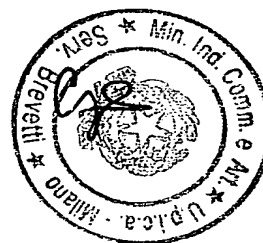
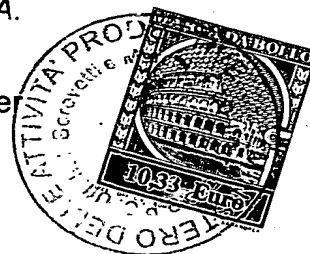
Milano, li 30.03.2000

p. INALCO S.p.A.

il Mandatario,


Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



Mani

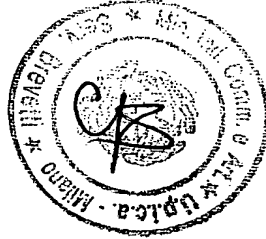
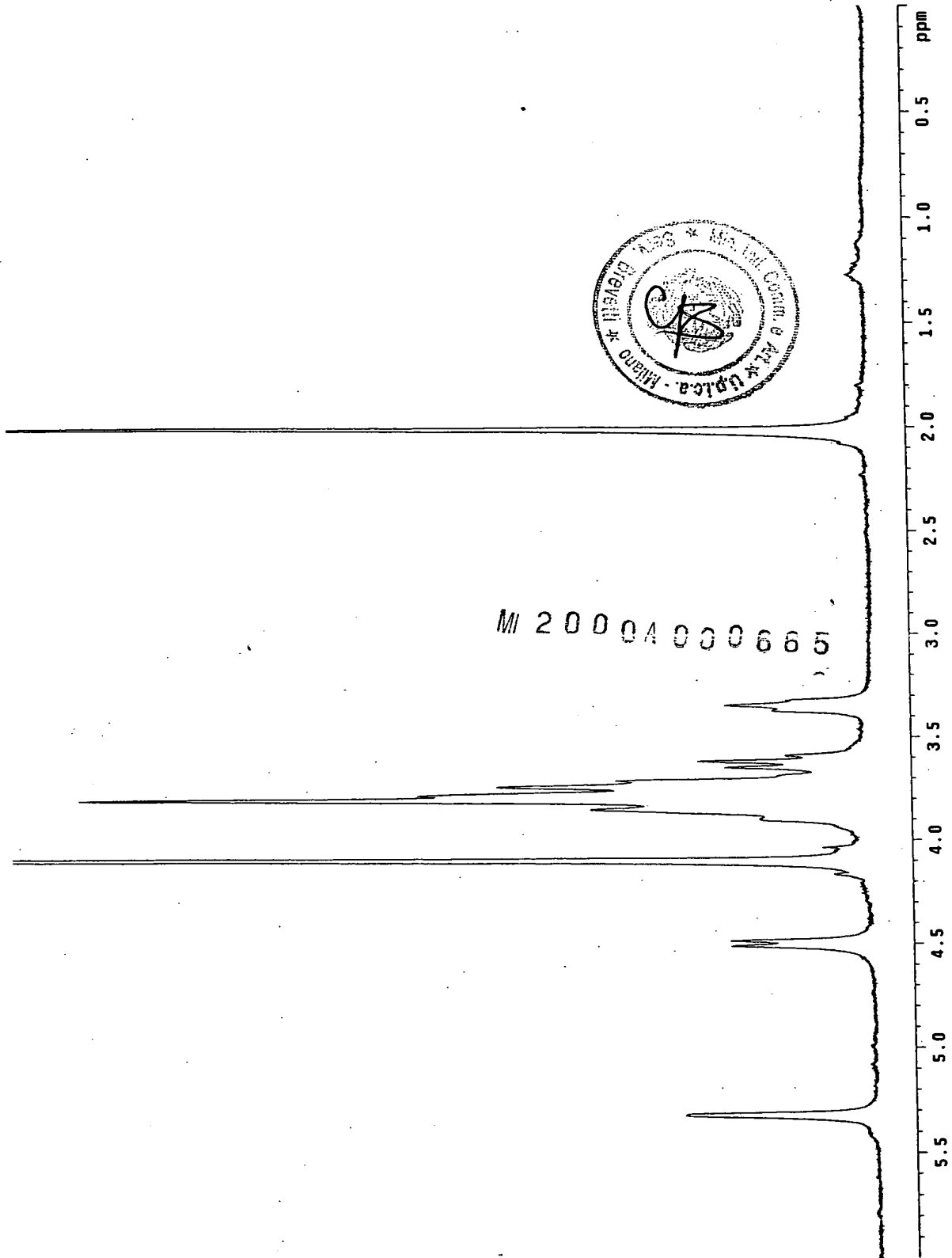


FIGURA 1

RV

[Handwritten signature]

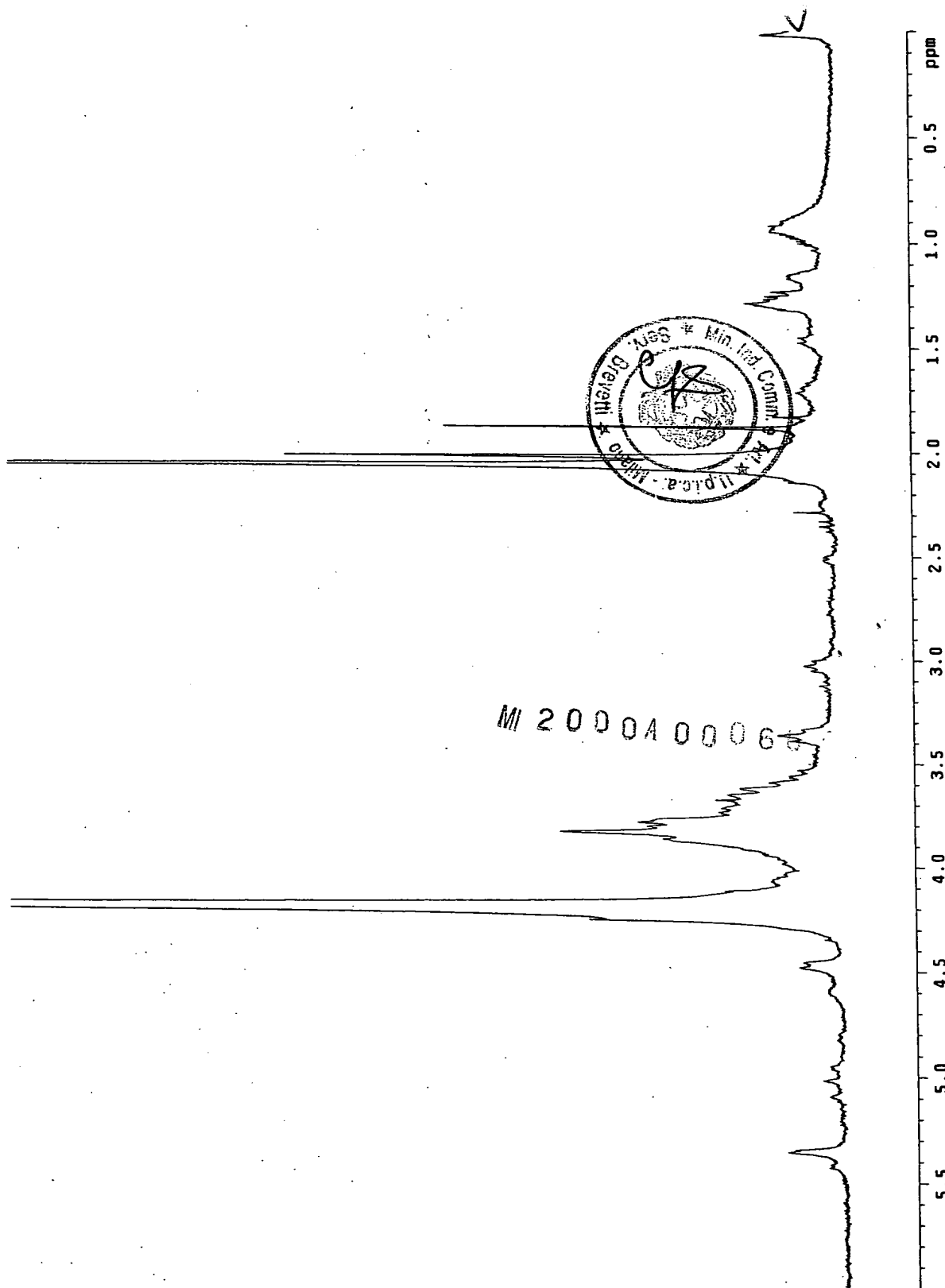


FIGURA 2

Più

[Handwritten signature]

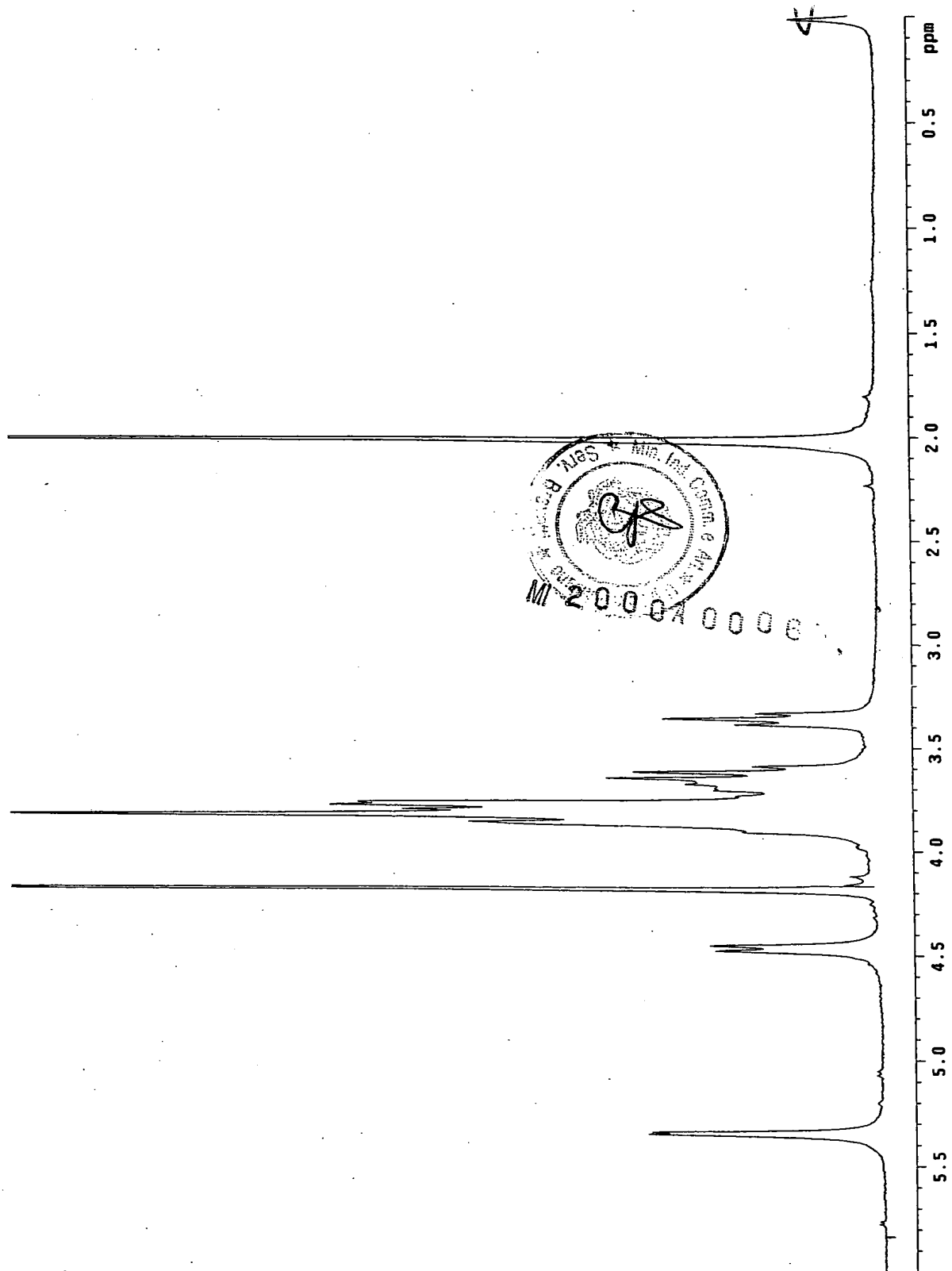


FIGURA 3

[Handwritten mark]

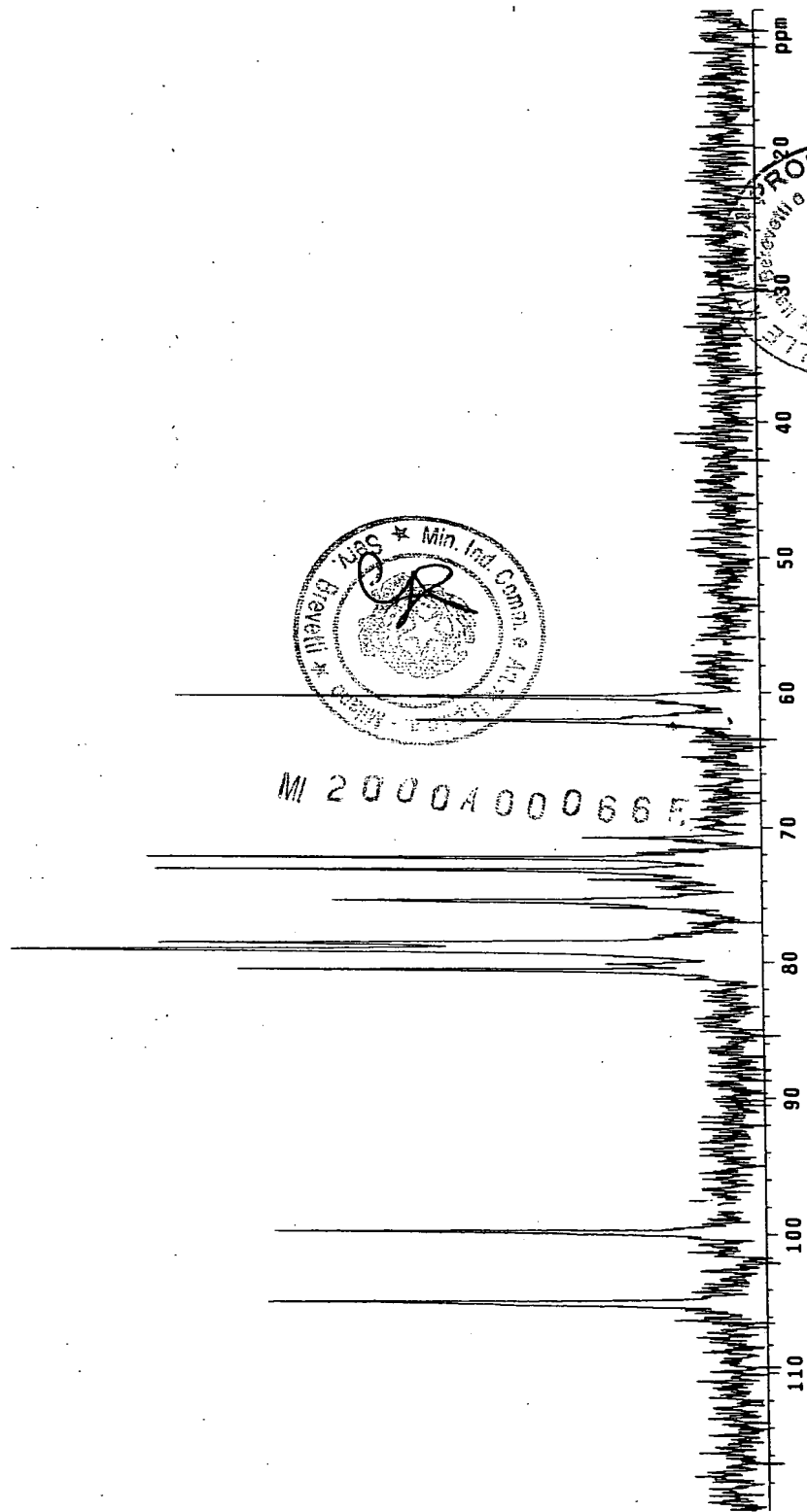


FIGURA 4

[Handwritten signature]

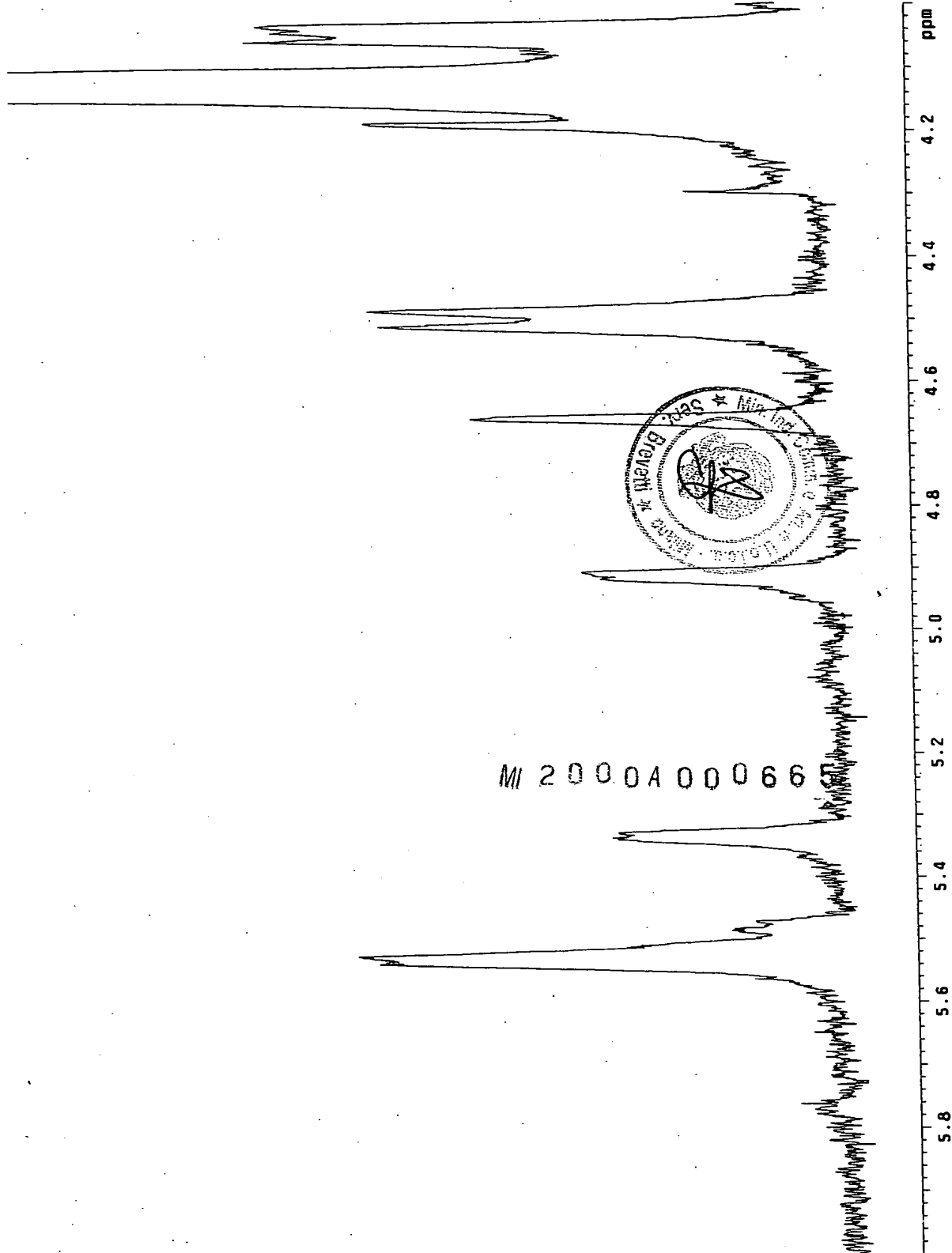


FIGURA 5

[Handwritten signature]

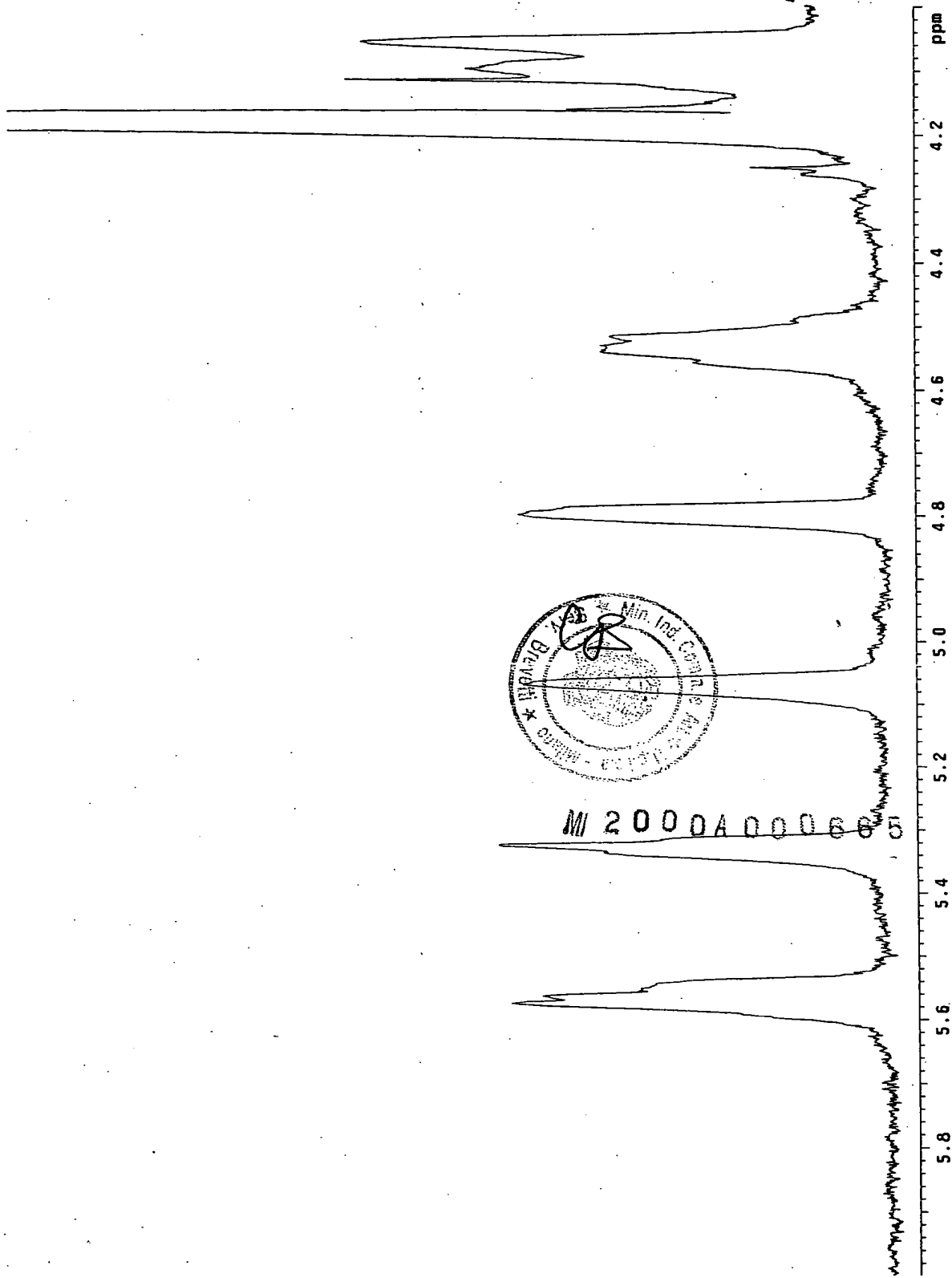


FIGURA 6

Pic

Min.

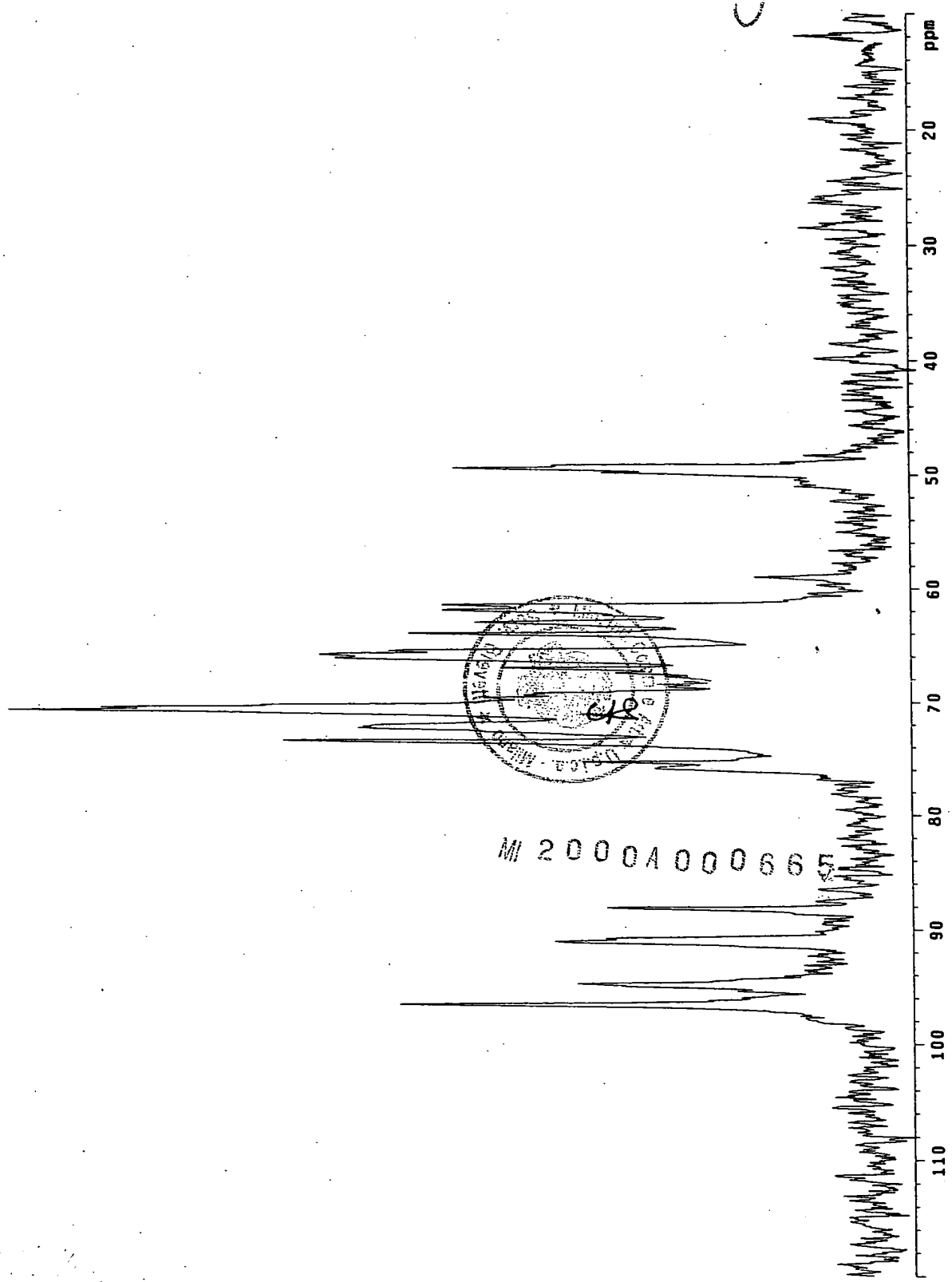


FIGURA 7

[Handwritten signature]

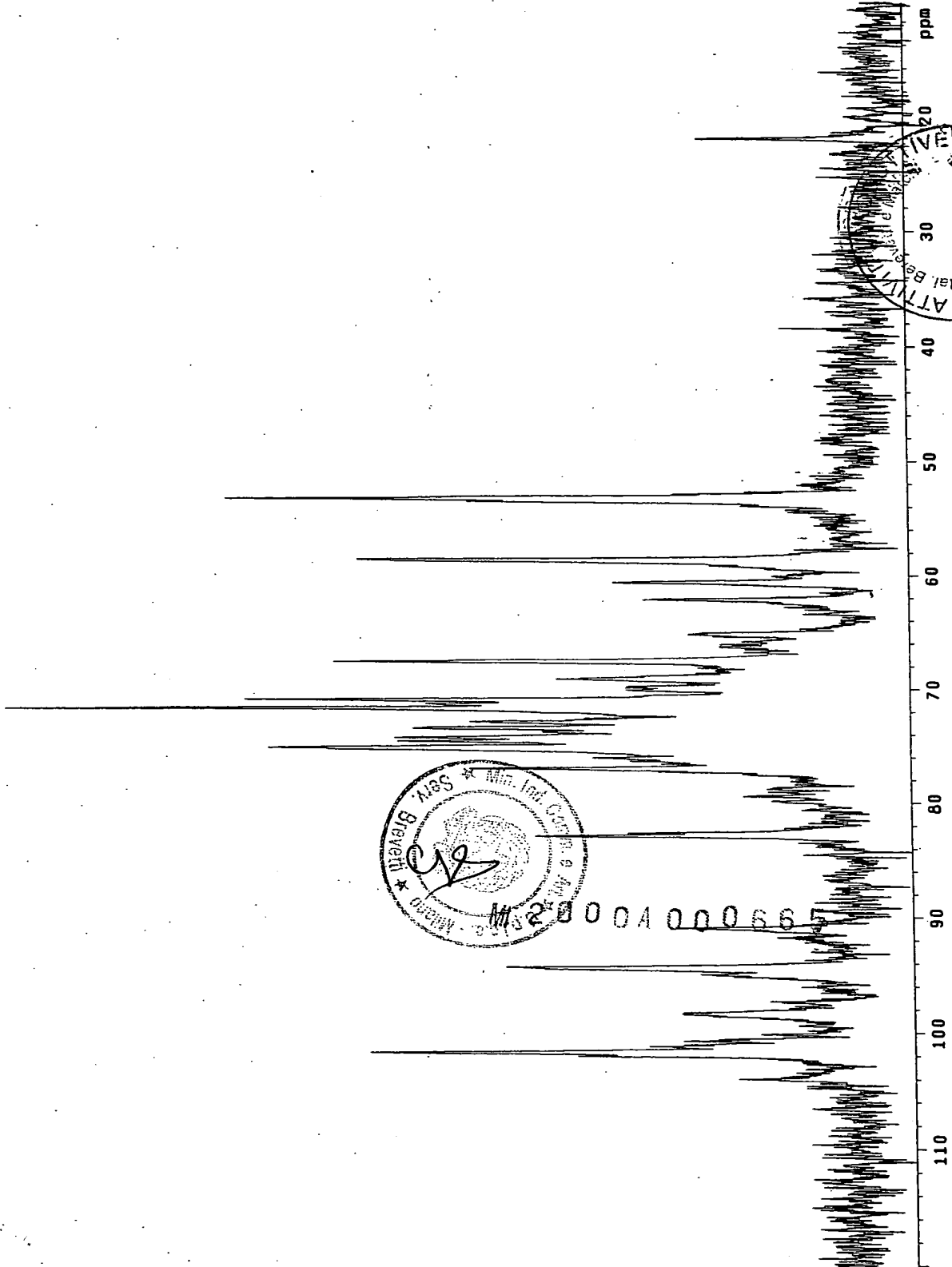


FIGURA 8

Piv

Thin

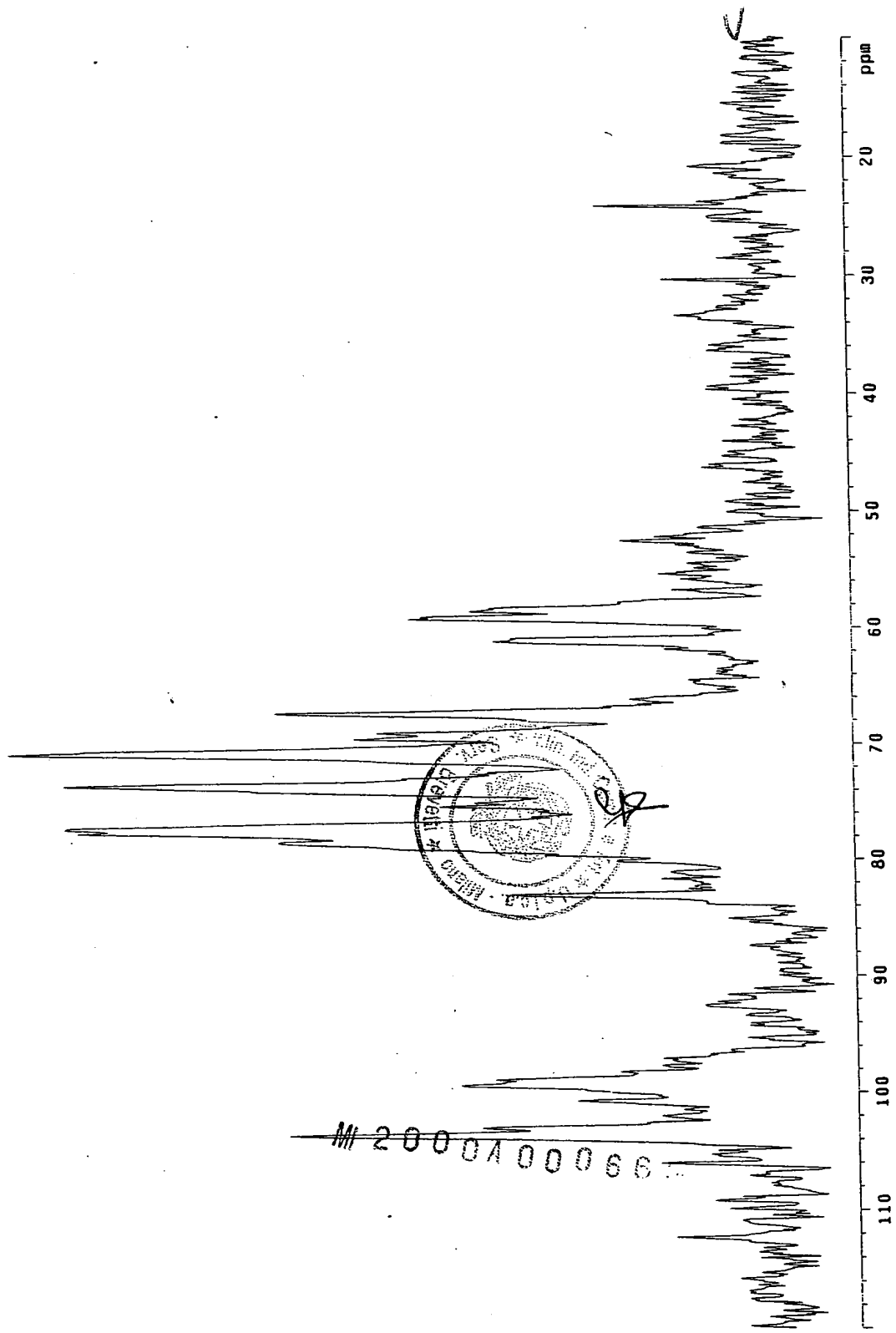


FIGURA 9

[Handwritten signature]

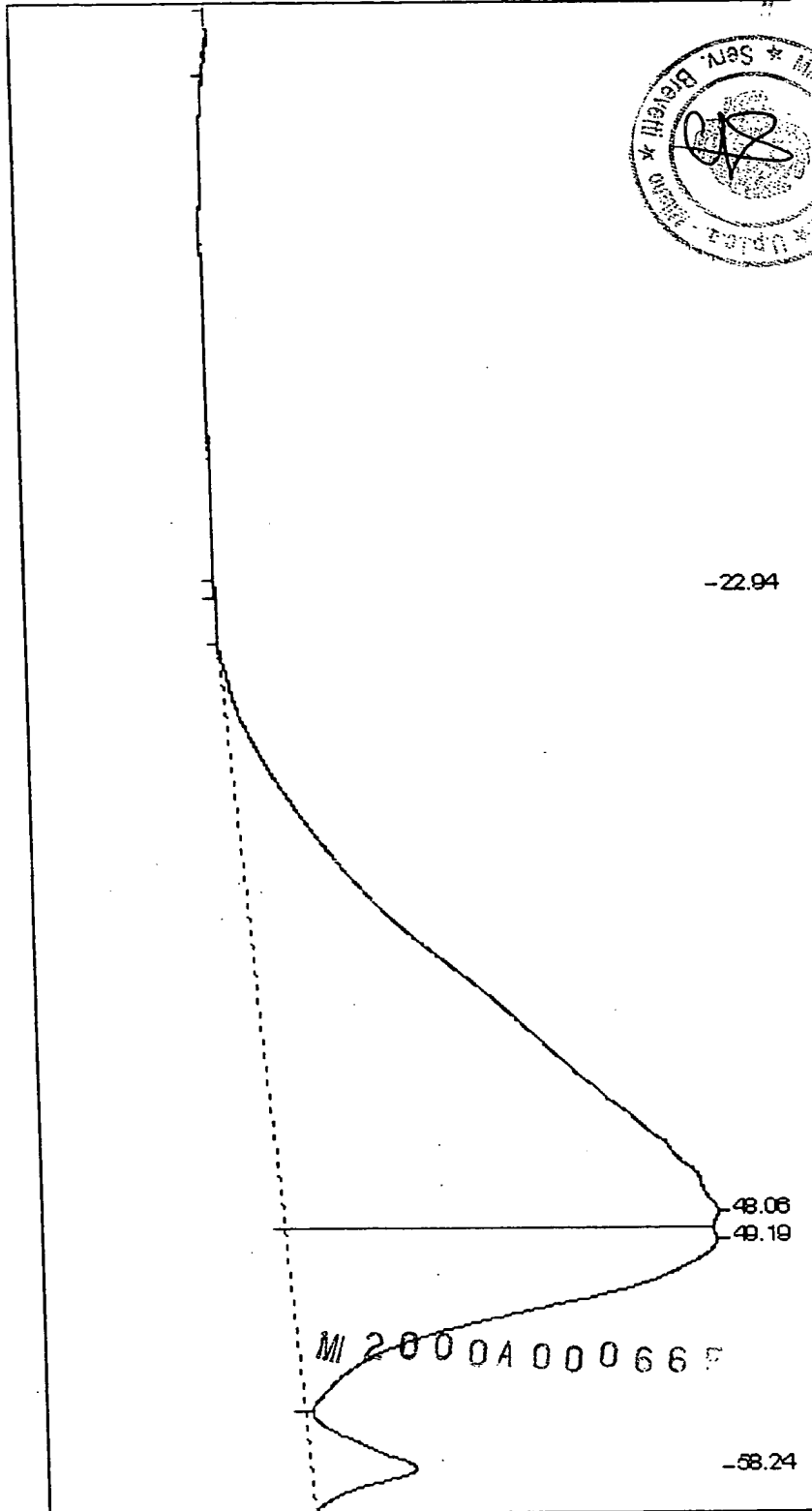
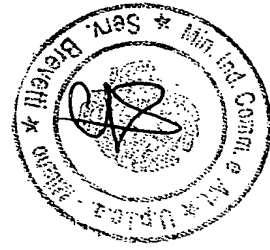


FIGURA 10

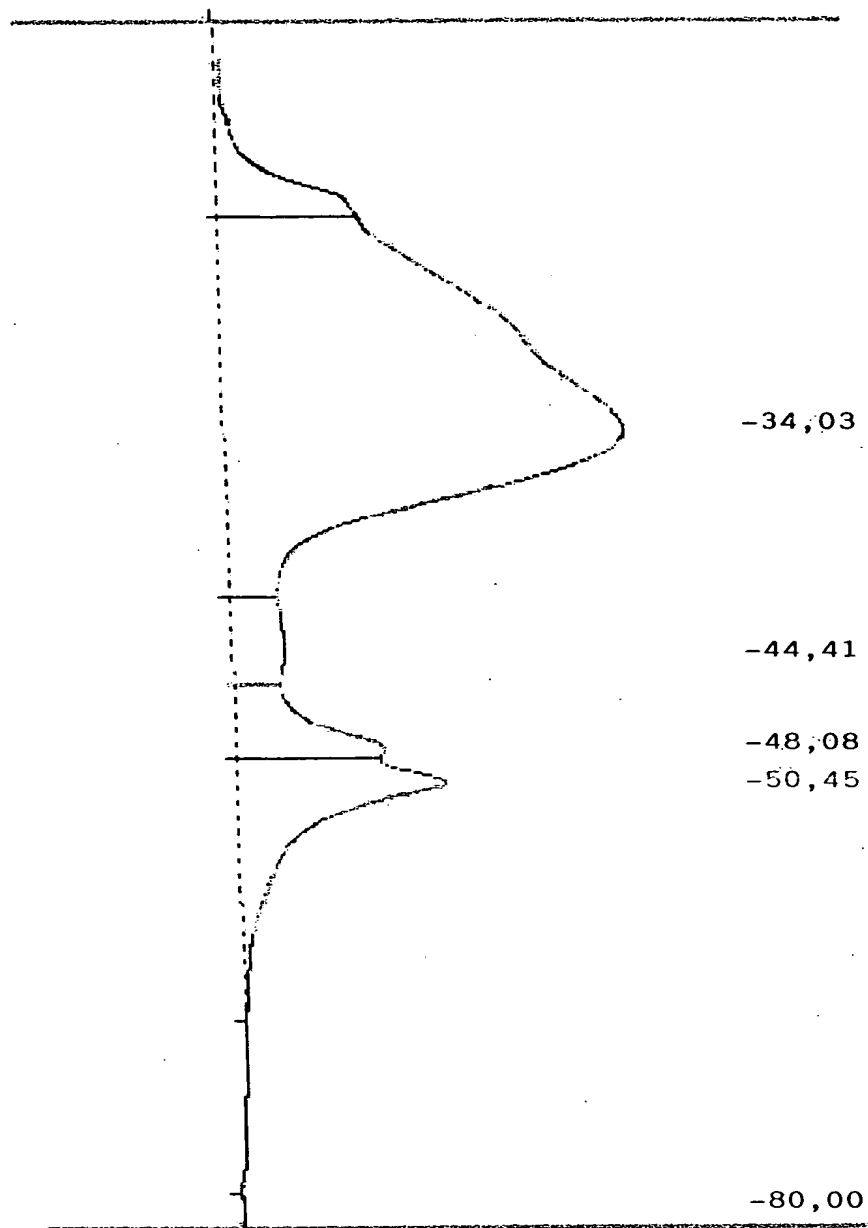
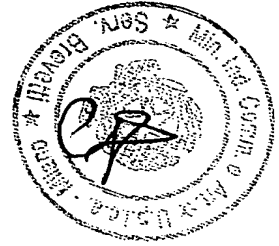


FIGURA 11A

MI 2000A000665

Handwritten signature

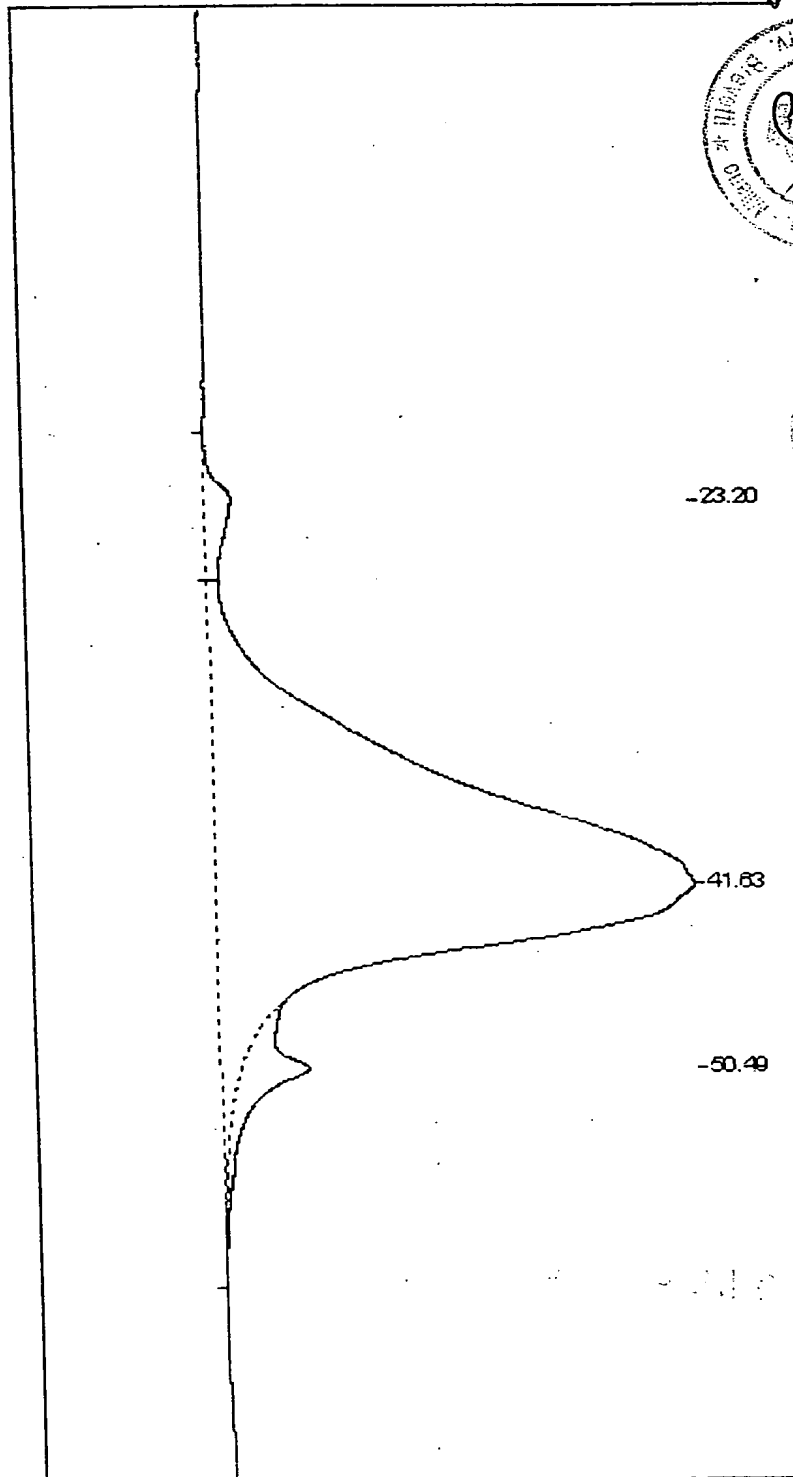


FIGURA 11B